



Lietuvos  
Respublikos  
valstybinis  
patentų biuras

(11) **LT 2024 544 A**

(51) Int. Cl. (2026.01): **C12Q 1/6806  
C12N 15/10**

## (12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2024 544**

(22) Paraiškos padavimo data: **2024-12-06**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2026-06-10**

(71) Pareiškėjas:

**UAB "Genomika", K. Petrausko g. 26, 544156 Kaunas, LT**

(72) Išradėjas:

**Rūta PALEPŠIENĖ, LT  
Gediminas ALZBUTAS, LT  
Simonas JUŽENAS, LT  
Lukas ŽEMAITIS, LT  
Ignas GALMINAS, LT  
Mantas Simutis, LT**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Liudmila GERASIMOVICH, 9, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“, Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**DNR bibliotekos paruošimo būdas**

(57) Referatas:

Šis išradimas pateikia inovatyvų DNR bibliotekų ruošimo būdą, kuris optimizuoja tradicinius procesus, pasitelkiant restrikcijos endonukleazes. Siūlomas sprendimas leidžia vienoje reakcijoje ne tik paruošti DNR fragmentų galus, bet ir juos liguoti su adapteriais, įskaitant galimybę efektyviai atlikti ligavimą per tarpą (pvz., kai fragmentai turi kelių nukleotidų išsikišimą, suderinamą su adapterių vieno nukleotido išsikišimu). Tai reikšmingai supaprastina procesą ir sumažina klaidų tikimybę. Naudojant RE, vienu metu atliekamos fragmentų fosforilavimo, adenilavimo ir lipnių galų paruošimo reakcijos, kurios leidžia efektyviau ir greičiau paruošti bibliotekas. Šis metodas yra suderinamas su standartinėmis sekoskaitos platformomis ir pritaikomas genomo tyrimuose, tikslinėje sekoskaitoje bei duomenų saugojimo DNR molekulėse. Šis sprendimas ženkliai padidina sekoskaitos efektyvumą ir kokybę, kartu išsaugodamas proceso paprastumą bei ekonomiškumą.

**LT 2024 544 A**

## **Išradimo sritis**

Išradimas priskirtinas biotechnologijos ir molekulinės biologijos sritims, įskaitant nukleino rūgščių analizės technologijas, konkrečiau apima DNR bibliotekų paruošimo būdus.

Išradimas gali būti naudojamas įvairiose srityse, kuriose reikia efektyviai paruošti DNR bibliotekas, apimant, bet neapsiribojant, tokiomis taikymo sritimis kaip DNR duomenų saugojimas, genomo tyrimai, tikslinis genų sekos nustatymas, diagnostika, biomedicinos tyrimai, farmakogenomika, personalizuota medicina ir kt.

## **Žinomas technikos lygis**

Naujos kartos technologijų atsiradimas iš esmės pakeitė genomikos tyrimų kryptį, įgalinant itin efektyvią ir ekonomiškai prieinamą nukleorūgščių (DNR ir RNR) analizę (SATAM H et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*. 2023, Vol.12, No.7, page 997).

Yra žinomi ir paprastai naudojami įvairūs DNR bibliotekų paruošimo būdai, tradiciškai jie apima: 1) DNR fragmentavimą (jei to reikia), 2) gautų fragmentų galų paruošimą, 3) adapterių ligavimą.

Šiame aprašyme terminas „adapteris“ reiškia trumpą DNR fragmentą, skirtą prijungti prie ruošiamos DNR bibliotekos fragmentų, užtikrinant jų imobilizaciją, amplifikaciją ar kitą techninę paskirtį. Adapteriai gali turėti specifinius lipnius galus, pradmenų pririšimo vietas ar indeksavimo sekas, pritaikytas įvairioms molekulinės biologijos ir biotechnologijos sritims.

DNR fragmentavimo stadija gali būti atliekama naudojant fizinį arba fermentinį poveikį. Yra žinoma, kad fermentinio fragmentavimo atveju, restrikcijos endonukleazės (RE) ar jų mišinys inicijuoja dvigrandės DNR trūkius specifinėse vietose bei trumpų fragmentų susidarymą (LOENEN WAM et al. Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. 2014, Vol.42, No.1, pages 3–19).

DNR bibliotekos paruošimui reikalingas fragmentų galų paruošimas ir adapterių ligavimas yra atliekami veikiant specifiniams fermentams ar jų mišiniams, kurie skiriasi nuo fermentų, kurie gali būti naudojami fermentiniam fragmentavimui.

Žinomi DNR bibliotekų paruošimo būdai yra aprašyti eilėje nepatentinių publikacijų (CHEN H et al. Characterization and mitigation of artifacts derived from NGS library preparation due to structure-specific sequences in the human genome. *BMC Genomics*. 2024, Vol.25, No.1, page 227; HEAD SR et al. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques*. 2014, Vol.56, No.2, pages 61–77.; PODNAR J et al. Next- Generation Sequencing RNA-Seq Library Construction. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2014, Vol.106, No.1; VAN DIJK EL et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*. 2014, Vol.30, No.9, pages 418–426.; WOLF K et al. Next-Generation Sequencing Library Preparation from FFPE Tissue Samples. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2016, Vol.113, No.1).

DNR bibliotekų paruošimo metoduose, aprašytuose šiose publikacijose, dažnai išskiriami tam tikri trūkumai, susiję su fragmentacijos procesu. Pvz., naudojant fragmentacijai fermentus, tokius kaip DNazė I ar fragmentazė, gali atsirasti netolygi fragmentacija arba sekos šališkumas, priklausantis nuo fermentų specifiškumo tam tikriems sekų motyvams. Tai ypač aktualu, kai siekiama, pavydžiui, tolygios sekų reprezentacijos sekoskaitos duomenyse (HEAD SR et al. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques*. 2014, Vol.56, No.2, pages 61–77.; VAN DIJK EL et al. Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. *Experimental Cell Research*. 2014, Vol.322, No.1, pages 12–20). Be to, fermentų naudojimas gali sukelti artefaktų atsiradimą sekoskaitos rezultatuose. Pavyzdžiui, CHEN H et al. Characterization and mitigation of artifacts derived from NGS library preparation due to structure-specific sequences in the human genome. *BMC Genomics*. 2024, Vol.25, No.1, page 227 aptaria netikėtus sekos artefaktus, ypač esant mažam variantų alelio dažniui.

Galiausiai, tokie metodai kaip RAD-seq, kurie naudoja restrikcijos endonukleazes, yra riboti tuo, kad jie fragmentuoja DNR tik tam tikrose vietose, priklausomai nuo atpažinimo sekų, kas gali lemti svarbių genomo regionų praleidimą ir nepakankamą sekoskaitos aprėptį (VAN DIJK EL et al. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends in Genetics. 2014, Vol.30, No.9, pages 418–426).

Restrikcijos endonukleazių naudojimas, ruošiant DNR bibliotekas, yra paminėtas taip pat keletame patentų, įskaitant: US11142789B2 (EP1954818B1), US11781170B2 (EP3724353A1), EP3130673A1, EP3049518B1, EP3963093 A4, WO2023024464 ir kt.

Šiuose patentuose restrikcijos endonukleazės dažniausiai naudojamos tik DNR fragmentavimo stadijoje, o DNR galų paruošimas atliekamas naudojant fermentinius procesus, tokius kaip fosforilimas (fosfato grupės pridėjimas) ir adenilimas (adenino nukleotido pridėjimas), prieš pradėdant fragmentų ligavimą prie adapterių. Taigi, paprastai DNR fragmentai negali būti tiesiogiai liguojami po restriktazių naudojimo fragmentacijai, todėl bendras DNR bibliotekų paruošimo procesas yra gana sudėtingas, dėl ko didėja klaidų tikimybė galutiniame rezultate.

Pavyzdžiui, patente US11781170 (EP3724353 A1) aprašomas bibliotekų paruošimo būdas sekoskaitai, naudojant restrikcijos fermentą ir susidedantis iš keleto fermentinių etapų, kad DNR fragmentai būtų paruošti ligavimui. Šis metodas nenaudoja restriktazių DNR fragmentų galų paruošimui/taisymui, o jos naudojamos iš esmės tik kaip reagentas, leidžiantis išvengti nenorimo ligavimo produkto. Taip pat šioje publikacijoje aprašomas restriktazės naudojamos vienos DNR grandinės trūkio sekoje sukūrimui, nuo kurio prasideda RCA (besisukančio ciklo amplifikacija). Restriktazės šiuo atveju nėra naudojamos proceso paspartinimui ar supaprastinimui.

Yra žinomi sprendimai, tokie kaip EP3963093 A4, kur vienos specifinės restriktazės („first restriction enzymes“, pvz. MspI) naudojamos tam, kad būtų sukurti DNR fragmentai, tinkami ligavimui ruošiant biblioteką, o kitos („second restriction enzymes“, pvz. SmlI ir kt.) – kad būtų suardomi ligacijos metu susidarę adapterių dimerai. Šiame patente aprašomas nukleorūgščių paruošimo būdas apima fragmentų su prijungtais adapteriais amplifikaciją, o restriktazės naudojamos kaip reagentas, siekiant sumažinti adapterių dimerų kiekį. Tai pasiekama diferencijuojant sankirtą tarp adapterio ir DNR fragmento bei tarp dviejų adapterių, specifiniu būdu hidrolizuojant būtent pastarąją jungtį. Šio metodo esminis trūkumas yra tas, kad norint jį naudoti ruošiant naujos kartos sekoskaitos biblioteką, reikalingi specifinio dizaino adapteriai – negalima naudoti standartinių adapterių su 3'-A išsikišimu. Dėl to metodo pritaikymas yra ribotas tokiose sistemose, kuriose naudojamos fiksuotos adapterių sekos. Be to, aprašomas būdas įveda keletą papildomų žingsnių lyginant su tradiciniu bibliotekos paruošimo protokolu – DNR biblioteka tampa paruošta naudojimui tik po papildomo padauginimo, taip pat įvedamas papildomas karpymo žingsnis, kuris dar labiau komplikuoja procesą.

Patente EP3130673 B1 aprašoma Y formos adapterių ir sunaikinamų restrikcijos vietų naudojimas bibliotekų konstravimui. Restriktazių panaudojimo paskirtis čia yra labai panaši kaip ir aukščiau apžvelgtame patente. Šio būdo atveju nukleino rūgštys bei Y formos adapteriai apdorojami tirpalu („fermentų kokteiliu“), susidedančiu iš vieno tipo restriktazių („first restriction enzymes“: pvz., MspAI, PstI, AluI) DNR fragmentavimui, bei kito tipo restriktazių („second restriction enzyme“, pvz., PmeI), kurios gali kirpti sekas, atsirandančias dėl adapterių dimerų susidarymo, veikiant ligazei. Šio metodo fermentinio apdorojimo stadijos vyksta viename tirpale naudojant subalansuotas ligazės ir restriktazės koncentracijas. Būdas tiesiogiai nėra pritaikomas naujos kartos sekoskaitos bibliotekoms paruošti, o norint jį adaptuoti, reikėtų specifinės sekos adapterių, kas sukeltų pritaikomumo apribojimų tokiose sekoskaitos platformose kaip „Oxford Nanopore“ (ONT) ar kitose sistemose, kuriose naudojamos fiksuotos adapterių sekos.

O patento paraiškoje WO2023024464A1 (EP4394096) aprašomi DNR bibliotekų paruošimo būdai, kur teigiama, kad DNR fragmentavimas atliekamas naudojant du DNR hidrolizuojančius fermentus, nurodytus kaip

VVN ir T7. Remiantis santrumpomis ir aprašytomis funkcijomis, galima daryti prielaidą, kad VVN atitinka *Vibrio vulnificus* nukleazę, kuri nespecifiškai skaido DNR, o T7 tikėtina yra T7 nukleazė iš bakteriofago T7. Nors autoriai nurodo šiuos fermentus kaip restriktazes, biocheminiu požiūriu jie priskirtini nukleazėms, nes neskaido DNR ties specifinėmis sekomis, kaip tai daro restriktazės. Be to, patikrinus 2024 m. spalio mėnesį „REBASE“ duomenų bazėje (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>), fermentų su tokiais pavadinimais restriktazių sąraše nėra. Publikacijos aprašyme nurodoma, kad naudojant minimus fermentus sukurti fragmentai negali būti tiesiogiai naudojami ligavimui prie adapterių - jie turi būti papildomai apdoroti kitais fermentais.

Kitas sprendimas, aprašytas WO2015160895A2, apima būdus, kurie naudoja kitos klasės DNR hidrolizuojančius fermentus - modifikuotas transpozazes, kad padidintų fragmentavimo nespecifiškumą sekai. Šie transpozazėmis pagrįsti būdai leidžia vienu metu fragmentuoti ir įterpti tinkamus adapterius, taip sumažinant bibliotekų paruošimui reikalingų žingsnių skaičių. Tačiau šis būdas gali būti netinkamas tokiais atvejais kaip informacijos saugojimas, pasitelkiant DNR, ar tikslinės sekos nustatymas, kur svarbu išlaikyti viso ilgio specifinius fragmentus.

Patente EP3049518B1 aprašomos fermentų kompozicijos DNR galų paruošimui (adenilinizacijai ir fosforilinizacijai), kurios būtinos DNR fragmentų paruošimui ligavimui. Nors šis būdas siūlo integruotą sprendimą (apdorojimas fermentų kompozicija vykdomas viename konteineryje), procesas apima kelis apdoravimo žingsnius prieš pradėdamas ligavimą, todėl proceso trukmė ir sudėtingumas nėra optimizuoti. Patente pristatomas būdas nesiūlo restriktazių naudojimo, o tik pamini galimybę naudoti restriktazes DNR fragmentavimui bibliotekos paruošimo procese ir konkrečias reakcijos sąlygas DNR fragmentų galų paruošimui. Šis sprendimas apsiriboja vien DNR galų paruošimo stadija ir atitinkamomis kompozicijomis ir nekonkretizuoja fragmentavimui naudotų restriktazių, nepateikia jokių įrodymų ir neteigia, kad šis būdas yra pranašesnis už kitus DNR fragmentavimo aspektu.

Be patentuotų/patentinėse paraiškose aprašytų būdų paruošti DNR fragmentų bibliotekas, kurie naudoja restriktazes, yra paminėtinas publikuotas CUTseq metodas (ZHANG X et al. CUTseq is a versatile method for preparing multiplexed DNA sequencing libraries from low- input samples. Nature Communications. 2019, Vol.10, No.1, page 4732). Tai nepatentuotas sprendimas, naudojantis restriktazes bibliotekų paruošimui iš mažo kiekio pradinių DNR mėginių, kurių yra didelis kiekis. Nors CUTseq leidžia prieš bibliotekų konstravimą pažymėti ir amplifikuoti genomų bibliotekas panaudojant restriktazes, metodas taip pat reikalauja papildomo apdoravimo prieš ligavimo žingsnį, kaip ir anksčiau aptartuose patentuotuose/patentinėse paraiškose.

Artimiausiu siūlomam DNR bibliotekos paruošimo sekvenavimui būdai laikytinas ONT protokolas [ONT, 2024, *ONT website, accessed 02 October 2024,*

<https://nanoporetech.com/document/ligation-sequencing-amplicons-sqk-lsk114>], toliau šiame aprašyme vadinamas standartiniu protokolu dėl jo plataus naudojimo.

Standartinio, ligavimu paremto, DNR bibliotekos paruošimo atveju, po DNR fragmentų padauginimo naudojant DNR polimerazes, tokias kaip Taq ar Pfu, išskiriami 2 esminiai žingsniai: 1) DNR fragmentų galų paruošimas; 2) ligavimas su adapteriais. Minėtos reakcijos atliekamos naudojant komerciškai prieinamus reagentus ar jų rinkinius. ONT platformos atveju DNR galų paruošimui naudojama fermentų kompozicija, atliekanti fosforilinizaciją ir adenilinizaciją (NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module, NEB), o ligavimas su adapteriais atliekamas naudojant T4 ligazės fermento mišinį (NEBNext® Quick Ligation Module, NEB). DNR galų paruošimo metu, veikiant fermentų mišiniui, DNR seka yra fosforilinama (pridedama 5'-fosfato -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup> grupė) ir adenilinama (pridedamas papildomas adenino nukleotidas (-A) prie 3' galo). Tikslus fermentų mišinys ir reakcijos sąlygos pasirenkami priklausomai nuo naudojamų reagentų, ir jų pasirinkimo principai yra gerai žinomi šios srities specialistams.

DNR galų paruošimas, įskaitant 5' fosforilinimą, paprastai atliekamas veikiant 3 fermentams ar jų mišiniui, kuris sudarytas iš: T4 DNR polimerazės, T4 DNR polinukleotido kinazės bei Klenow fragmento. Tuo tarpu 3' adenilimas gali būti atliekamas, veikiant rekombinantinei Taq polimerazei arba Klenow fragmentui (exo-) (HEAD SR et al. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. BioTechniques. 2014, Vol.56, No.2, pages 61–77).

Po tokios fermentinės reakcijos DNR fragmentas turi fosfato grupes 5' galuose ir bent vieno - A išsikišimus sekų 3' galuose. Tokiu būdu paruošti fragmentai yra suderinami su sekoskaitos adapteriais, turinčiais bent jau vieno timino (-T) išsikišimą 3' gale. Ligavimo su adapteriais metu, naudojant T4 DNR ligazės fermentą, inicijuojamas naujo fosfodiesterinio ryšio susidarymas tarp paruošto DNR fragmento ir adapterių. Tik atlikus abu šiuos etapus, DNR fragmentas gali būti naudojamas konkrečiam taikymui.

Reziumuojant, pabrėžtina, kad DNR bibliotekų paruošimo būdas pagal standartinį protokolą apima tokias esmines stadijas:

- DNR fragmentai pirmiausia modifikuojami, kur fragmentų galai, veikiant komerciškai prieinamais fermentais/fermentų mišiniu, paruošiami tolesniam ligavimui su adapteriais. Reakcijos metu fragmento 3' gale pridedamas adenino išsikišimas (-A), o 5' gale laisva fosfato grupė. Komerciškai prieinamo fermento/fermentų mišinio sudėtyje nėra restrikcijos endonukleazių;

- po DNR fragmentų galų paruošimo jie yra liguojami su suderinamais adapteriais, pasižyminčiais timino išsikišimu (-T) adapterinės sekos 3' gale.

Kiek yra žinoma autoriams ir pareiškėjui, apžvelgtuose šaltiniuose nėra užuominos apie galimybę, ruošiant bibliotekas, panaudoti RE ne tik DNR fragmentavimui (jei jo reikia), tačiau ir DNR galų paruošimui arba ligavimui ir ligavimui, abu procesus atliekant vienos reakcijos metu. Nors WO2020223250 publikacijoje siūlo galimybę naudoti restrikcijos endonukleazes (RE) adapterių ir sekos suderinamumui užtikrinti, bet minėtuose šaltiniuose nėra nurodyta, jog galima atlikti ligavimą su tarpu: liguoti fragmentus, kai DNR fragmentas turi 2 ar daugiau adeninų (3'-AA) išsikišimą, o sekoskaitos adapteris tik vieną timino (3'-T) išsikišimą.

Tokiu būdu, egzistuoja poreikis efektyvesniems ir paprastesniems bibliotekų paruošimo būdams, ypač tokių taikymų kaip DNR duomenų saugojimas atveju, kur naudojamos *de novo* susintetintos sekos ar tikslinės amplifikacijos produktai. Šis poreikis kyla siekiant didinti sekos nustatymo greitį ir tikslumą, tuo pat metu mažinant bibliotekų paruošimo proceso kompleksumą ir sąnaudas.

Būtų itin aktualu optimizuoti DNR bibliotekų paruošimo ir jų taikymo procesus, išlaikant aukštą sugeneruotų sekų kokybę bei pagreitinant ir/arba supaprastinant DNR bibliotekų paruošimo procesą. To būtų galima pasiekti, pavyzdžiui, sujungiant DNR fragmentų galų paruošimą ir ligavimą į vieną reakciją bei išvengiant papildomų fermentinių reakcijų.

Techninė siūlomo išradimo užduotis yra sukurti būdą, kuris užtikrintų efektyvų ir patikimą DNR fragmentų paruošimą bei ligavimą su adapterinėmis sekomis per minimalų laiko intervalą nepabloginant proceso kokybės parametrų bei minimizuojant žmogiškosios klaidos tikimybę.

### **Išradimo esmė**

Siekiant įveikti minėtas problemas ir praplėsti DNR bibliotekų paruošimo galimybes, siūlomas techninis sprendimas, kuris apibūdinamas visuma požymių, išdėstytų išradimo apibrėžties punktuose. Šio išradimo esmė yra būdas, leidžiantis tiesiogiai liguoti DNR fragmentus iškart po restrikcinių naudojimo arba net apjungti DNR fragmentų galų paruošimą ir ligavimą į vieną reakciją. Tai leidžia išvengti papildomų fermentinių apdorojimų, taip sumažinant proceso trukmę ir kompleksumą.

Esminis siūlomo būdo požymis yra tai, kad galima atlikti ligavimą „per tarpą“ arba su tarpu.

„Ligavimas per tarpą” šiame aprašyme suprantamas kaip procesas, kai dvigrandė DNR, turinti vienos iš grandinių išsikišimą (pvz., 3'-AA), jungiasi su adapteriu, kurio galas turi komplementarų, bet trumpesnį vieno nukleotido išsikišimą (pvz., 3'-T). Ligavimo reakcijos metu susidaro laikina struktūra, kur tarp 3' ir 5' galų išlieka vieno ar daugiau nukleotidų tarpas. Šią struktūrą efektyviai atpažįsta ir sujungia T4 DNR ligazė arba kitas tinkamas fermentas, formuodamas galutinį stabilų fosfodiesterinį ryšį.

Siūlomas DNR bibliotekos paruošimo būdas apima:

- DNR fragmentų galų paruošimą, siekiant gauti turintį bent vieno nukleotido ilgio išsikišimą 3' gale ir laisvą fosfato grupę 5' gale,
- DNR fragmentų ligavimą su adapteriais, pasižyminčiais vieną nukleotidą turinčiu išsikišimu adapterinės sekos 3' gale, kur adapterinės sekos išsikišimo nukleotidas yra komplementarus bent vienam DNR fragmento išsikišimo nukleotidui, ir
- nebūtinai vykdo DNR fragmentų padauginimą.

Nuo žinomo technikos lygio siūlomas būdas skiriasi tuo, kad:

- DNR fragmentų galų paruošimą arba galų paruošimą kartu su DNR fragmentų ligavimu vykdo veikiant restrikcijos endonukleazę, gebančią po DNR kirpimo palikti bent vieno nukleotido ilgio išsikišimą 3' gale, arba veikiant tokios restrikcijos endonuklezės funkciniu analogu;
- DNR fragmentų padauginimą vykdo su pradmenimis, apimančiais restrikcijos endonukleazęi būdingą restrikcijos atpažinimo sritį.

Išradimo įgyvendinimo variante DNR galų paruošimą vykdo vienu metu su ligavimu, kai minėta restrikcijos endonukleazė yra gebanti palikti 1-3 nukleotidų (nt) ilgio išsikišimą paruošto DNR fragmento 3' gale, kur bent vienas nukleotidas yra adeninas, o adapterinės sekos išsikišimo nukleotidas yra timinas.

Kitame išradimo įgyvendinimo variante minėtas paruošto DNR fragmento 1-3 nukleotidų ilgio išsikišimas 3' gale yra 1-3 adeninų išsikišimas.

Išradimo minėta restrikcijos endonukleazė yra pasirinkta iš MnlI, MboII, Eam1105I, TaaI, Eco57I, BseMI, AasI, Van91I, BglI, Cail, BseGI, BseLI, Adel, HpyF10VI, Mph1103I, BstXI, arba jų mišinio.

Tam tikrais išradimo įgyvendinimo atvejais adapteris yra sekoskaitos adapteris.

Siūlomame išradime minėtos restrikcijos endonukleazės funkcinis analogas yra pasirinktas iš programuojamų nukleazių, tokių kaip Cas9, Cas12, Cas12a (Cpf1), Cas13 bei į transkripcijos faktorius panašios efektorinės nukleazės (TALEN) ir cinko pirštų nukleazės (ZFN).

Išradimo įgyvendinimuose su programuojamomis nukleazėmis restrikcijos endonukleazės funkcinis analogas yra gebantis sudaryti DNR fragmentų galus su 1-3 bp išsikišimais 3' gale.

Siūlomo būdo įgyvendinime ligavimą vykdo su T4 ligaze be tarpinių etapų, kai DNR fragmentų galų paruošimo ir adapterių ligavimo reakcijos mišinyje esama:

- padaugintų DNR fragmentų su RAS 200-400 fmoI;
- adapterių 5–10 kartų didesnio molinio kiekio nei padaugintų DNR fragmentų su RAS: 1000 – 4000 fmoI;
- 10 kartų koncentruoto greito kirpimo restrikcijos endonukleazių buferio 2 µl;
- ATP (10 mM) 0,3 - 3 µl;
- greito kirpimo restrikcijos endonukleazių, kurios 1 µl per 5 min, esant optimalioms sąlygoms, sukarmo >200 ng DNR 1 µl;
- T4 DNR ligazės (2,000,000 Weiss vienetų/ml) 1,0-5,0 µl;
- sterilaus vandens be nukleazių iki 30 µl reakcijos mišinio tūrio; reakcijos sąlygos apima inkubaciją 37–65°C 5 min ir 21–23°C 5 min, o kiekvieną reakciją sudaro 5-8 pasikartojantys ciklai.

Kitas išradimo objektas yra ligavimo jungties konstruktas, gaunamas siūlomu būdu, kuris yra sukonstruotas sėkmingam ligavimui ir apima DNR fragmentą su 1-3 nukleotidų, pasirinktų iš A, T, C arba G, išsikišimu 3' gale, bei adapterį su tik vieno nukleotido išsikišimu 3' gale, kur adapterinės sekos išsikišimo nukleotidas yra komplementarus bent vienam DNR fragmento išsikišimo nukleotidui; ir

kur konstrukto struktūra yra pasirinkta iš: 5'-Frag-X-3' / 3'-X-cFrag-5',

5'-Frag-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5',

5'-Frag-X-3' / 3'-X-X-cFrag-5',

5'-Frag-X-X-3' / 3'-X-X-cFrag-5',

5'-Frag-X-X-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5' arba

5'-Frag-X-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5',

kur:

„Frag“ žymi DNR fragmentų viršutinę grandinę,

„cFrag“ žymi jai komplementarią apatinę grandinę, ir

„X“ žymi vieną DNR nukleotidą, kuris yra viengrandžio išsikišimo dalis, pasirinktą iš A, T, C arba G.

Išradimo įgyvendinimo variante ligavimo jungties konstruktas yra sukonstruotas sėkmingam ligavimui per tarpą, kur konstruktas apima DNR fragmentą su dviejų arba trijų nukleotidų, pasirinktų iš A, T, C arba G, išsikišimu 3' gale, bei adapterį su tik vieno nukleotido

išsikišimu 3' gale, kur adapterinės sekos išsikišimo nukleotidas yra komplementarus bent vienam DNR fragmento išsikišimo nukleotidui; ir

kur konstrukto struktūra yra pasirinkta iš:

5'-Frag-X-X-3' / 3'-X-X-cFrag-5',

5'-Frag-X-X-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5' arba

5'-Frag-X-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5'.

Optimaliame išradimo įgyvendinimo variante ligavimo jungties konstrukto dviejų arba trijų nukleotidų išsikišimas DNR fragmento 3' gale yra 2-3 adeninai, o adapteris apima tik vieno timino išsikišimą 3' gale;

ir konstrukto struktūra yra pasirinkta iš:

5'-Frag-A-A-3' / 3'-A-A-cFrag-5',

5'-Frag-A-A-A-3' / 3'-A-A-A-cFrag-5', arba

5'-Frag-A-A-3' / 3'-A-A-A-cFrag-5'.

Išradimo būdo įgyvendinimas restriktazių pagrindu apima panaudojimą, kai DNR fragmentai yra gauti *de novo* DNR sintezės būdu. Minėtais atvejais būdas gali būti sėkmingai naudojamas duomenų saugojimo DNR taikymuose.

Išradimo būdo įgyvendinimas minėtų programuojamų nukleazijų pagrindu taip pat apima panaudojimą, kai DNR fragmentai yra gauti *de novo* DNR sintezės būdu. Šiais atvejais būdas yra tinkamas naudoti duomenų saugojimo DNR taikymuose.

### Trumpas paveikslų aprašymas

Siūlomas techninis sprendimas iliustruojamas brėžiniais (paveikslais), kuriuose:

1. pav. pavaizduota DNR fragmento struktūra, gaunama panaudojant restriktazę, pavyzdžiui, BseGI RE.
2. pav. parodyta išradimo siūlomo būdo atlikimo bendra schema (B), lyginant su standartiniu protokolu (A).
3. pav. DNR fragmentų, paruoštų naudojant skirtingas RE, ligavimo su adapteriais efektyvumo palyginimas.
4. pav. pateiktas DNR fragmentų paruošimą, naudojant standartinį ir išradimo RE pagrįstą protokolus, efektyvumo palyginimas.

5. pav. atvaizduoja DNR bibliotekos galų bei adapterių konfigūraciją prieš ligavimą iliustruojant išradimo protokolą.

6. pav. vaizduoja sekų konfigūraciją ir ligavimo efektyvumo įvertinimą adapterio ir sekvenuojamos DNR jungties vietoje.

### **Detalus išradimo aprašymas ir įgyvendinimo variantai**

Siekiant sumažinti DNR bibliotekų paruošimo proceso sudėtingumą, kaštus ir trukmę, šis išradimas siūlo būdą, kuris remiasi išradimo restrikcijos endonukleazių naudojimu DNR fragmentų paruošimui.

Restrikcijos endonukleazės yra iš bakterijų išskirti baltymai, kerpančys DNR specifinėse vietose. Žinomi keturi pagrindiniai restrikcijos fermentų tipai (I, II, III ir IV), kurie skiriasi baltymų subvienetų sudėtimi, specifiskumu sekai ir kofaktorių poreikiu (ALEKSEEVA IV et al. Historical Aspects of Restriction Endonucleases as Intelligent Scissors for Genetic Engineering. Fermentation. 2023, Vol.9, No.10, page 874).

Dažniausiai laboratorijoje yra naudojamos II tipo restrikcijos endonukleazės (RE), kurios specifiskai atpažįsta unikalią 4–8 nukleotidų ilgio seką, dar vadinamą restriktažės atpažinimo sritimi (RAS). Esant  $Mg^{2+}$  jonams terpėje, II tipo restrikcijos endonukleazės, aptikusios taikinį, inicijuoja fosfodiesterinio ryšio hidrolizę (DNR trūkius), palikdamos laisvą 5'-fosfato ( $5'-PO_3^{2-}$ ) grupę. RE gali kirpti DNR simetriškai, palikdamos „bukus“ galus, arba kirpti DNR pozicijose, kurios nėra tiesiai viena prieš kitą, taip palikdamos viengrandžius išsikišimus („lipnius“ galus). Taigi, naudojant II tipo restrikcijos endonukleazes, po kurių kirpimo paliekamas bent vieno 3'-adenino išsikišimas, DNR fragmentai tampa paruošti tolimesniam ligavimui kaip ir standartinio, fermentų mišiniu pagrįsto, paruošimo atveju. Be to, standartiniame protokole fosforilinimą ir adenilinimą atlieka skirtingi fermentai, todėl reakcijų efektyvumas gali varijuoti: ne visi fosforilinti fragmentai būtinai bus adenilinti. Tuo tarpu siūlomo išradimo atveju abi reakcijos atliekamos vieno fermento per tą pačią reakciją, todėl fragmentų paruošimas yra labai efektyvus.

Siūlomo išradimo būdo protokolas

Pirmiausia atliekama polimerazės grandininė reakcija su sekai specifiniais pradmenimis, turinčiais RAS 5' gale. Amplifikacijos reakcijos komponentų mišinys gali būti sudarytas iš: 1X PGR buferio; 0,2–0,25 mM kiekvieno dNTP; 1,5–4,5 mM  $MgCl_2$ ; 0,2–0,5  $\mu M$  tiesioginio pradmens; 0,2–0,5  $\mu M$  atvirkštinio pradmens; 1 pg–1 ng sintetinės DNR; 0,5–2,5 vienetų polimerazės ir  $H_2O$ , kai reakcijos tūris 50  $\mu l$ . Reakcijos sąlygos gali būti: 94–98 °C 1–5 min (pradinė denatūracija); 94–98°C 30s - 2 min (denatūracija); 55–70°C 30s - 2 min (pradmenų hibridizacija); 70–75°C 15s - 2 min/kb (grandinės ilgėjimas); 72 °C 1–10 min (galutinis grandinės ilgėjimas). Reakcijos ciklų skaičius gali būti 15–35. Esminė sąlyga: naudojami pradmenys turi atitikti 1 pav. B vizualizuotus kriterijus - sukurti specifinei RE reikalingą RAS, kur po kirpimo būtų paliekamas bent vieno adenino 3' (-A) išsikišimas.

Siūlomo išradimo DNR sekos struktūra (kaip pavyzdį naudojant BseGI RE) pavaizduota 1 pav., kur (A) nurodo atpažinimo vietos struktūrinių elementų išdėstymo schemą. „NNN“ žymi 3–6 nukleotidus prieš atpažinimo seką. Paryškinti nukleotidai žymi specifinį motyvą, užtikrinantį DNR fragmentų suderinamumą su sekoskaitos adapteriais. Pabraukti nukleotidai yra iliustracinio pobūdžio. (B) pavaizduota DNR fragmentų schema po kirpimo BseGI restrikcijos endonukleaze.

Padaugintas fragmentas tuomet naudojamas kartu (vienu metu) vykstančiai DNR fragmentų galų paruošimo ir adapterių ligavimo reakcijai. Šios reakcijos mišinys sudarytas iš: 200–400 fmoL padaugintos DNR su RE atpažinimo sritimi; 5–10 kartų didesnio molinio kiekio (nei padauginto DNR fragmento) sekoskaitos adapterių; 2  $\mu l$  restrikcijos fermentų buferio (10x koncentruoto); 0,1–1 mM ATP; 1  $\mu l$  restrikcijos endonukleazės; 1–10 vienetų T4 DNR ligazės, kai reakcijos tūris 30  $\mu l$ . Reakcijos sąlygos apima 37–65°C 5 min ir 21–23°C 5 min.

Kiekvieną reakciją gali sudaryti 5-8 ciklai. Po reakcijos mėginiai išvalomi, naudojant specialistui žinomus būdus, pavyzdžiui, SPRI paramagnetines daleles, išlaikant 1:1-1,8 DNR ir dalelių santykį.

DNR atpažinimo sritis (kaip pavyzdį naudojant BseGI restriktazę) yra matoma 1 pav. Motyvas, siekiant suderinamumo su sekoskaitos adapteriais (1 pav. A) ir fragmento struktūra po kirpimo (1 pav. B).

Siūlomo išradimo schema pavaizduota 2 pav., palyginant su anksčiau aprašytu žinomu standartiniu protokolu. Schemose matyti, kad išradimas (2 pav. B) pasižymi esminiais skiriamaisiais požymiais, lyginant su aprašytu standartiniu bibliotekų paruošimo būdu (2 pav. A):

#### 1. Reakcijų pobūdis.

Pagal siūlomą išradimą i) adenilinio ir forforilinio reakcijos pakeičiamos viena reakcija, kurią atlieka RE; ii) DNR padauginimui naudojami pradmenys, turintys restrikcijos atpažinimo sritis (RAS) 5' gale. Atpažinimo sričiai būdinga:

- a) turi būti sudaryta iš 3-6 nukleotidų ilgio motyvo prieš specifinės RE atpažįstamas sekas;
- b) parenkamo DNR motyvo RE atpažįstamos sekos 3' gale turi būti bent vienas timino (-T) nukleotidas.

#### 2. Reakcijai naudojami fermentai.

Pagal siūlomą išradimą DNR galų paruošimas atliekamas naudojant II tipo restrikcijos endonukleazes. Būtinasis esminis požymis: po pasirinktos restriktazės dvigrandės DNR kirpimo, turi likti 3' vieno ar daugiau adenino (-A) išsikišimas. Tuo tarpu standartinio protokolo atveju yra naudojami skirtingi fermentai ar jų mišiniai, kurių sudėtyje nėra restrikcijos endonukleazių.

#### 3. Reakcijos etapų skaičius.

Pagal siūlomą išradimą DNR fragmentų galų paruošimas ir ligavimas su adapteriais vyksta vienos reakcijos metu. Padaugintų fragmentų galai atpažįstami specifinės restrikcijos endonukleazės. Veikiant RE, DNR grandinė perkerpama, paliekant bent vieno (-A) išsikišimą 3'-gale bei laisvą fosfato grupę 5' gale, o papildomi nukleotidai, reikalingi tik atpažinimui, yra pašalinami. Išradimas nėra apribotas 3' išsikišimo ilgiu - ligavimo vieta gali būti sudaryta iš 1-3 nukleotidų, kurių bent vienas yra adeninas. Terpę papildžius ATP, RE aktyvumas yra suderinamas su T4 DNR ligazės aktyvumu. Tada T4 ligazė inicijuoja naujo fosfodiesterinio ryšio susidarymą tarp adapterinių sekų ir paruoštų fragmentų. Tokiu būdu paruošti fragmentai yra tinkami sekoskaitai.

Tuo tarpu standartinio protokolo atveju DNR fragmentų paruošimas vyksta dviejų, paeiliui vykstančių reakcijų metu. Vienos reakcijos metu vyksta DNR galų paruošimas, naudojant specifinius fermentus ar jų mišinius fosforilnimui bei adenilnimui. Tuomet kitos reakcijos metu modifikuoti DNR fragmentai yra liguojami su sekoskaitos adapteriais.

Išradime siūlomas būdas nėra apribotas viena restrikcijos endonukleaze ir gali būti taikomas naudojant, pavyzdžiui, MnlI, MboII, Eam1105I, Taal, Eco57I, BseMI, AasI, Van91I, BglI, Cail, BseLI, Adel, HpyF10VI, Mph1103I, BstXI, restrikcijos fermentus arba jų mišinius.

Išradimo būdas apima taip pat programuojamų nukleazių (Cas9, Cas12, Cas13, TALEN, ZFNs ir kt.) naudojimą kaip restriktazių funkcinių analogų

Šio išradimo kontekste terminas „restriktazių funkcinis analogas“ reiškia galėjimą funkciškai atlikti tą patį, ką daro restriktazės t.y. kirpti DNR grandinę ir, atitinkamai suprogramavus, palikti 1 arba daugiau nukleotidų išsikišimus sekos 3' gale.

Pagal siūlomą išradimo protokolą, kaip restriktazių analogą DNR fragmentų kirpimui ir paruošimui sekoskaitai, galima naudoti programuojamas nukleazes, tokias kaip Cas9, Cas12, Cas13, ir kt. bei į transkripcijos faktorius panašias efektorines nukleazes (TALEN) ir cinko pirštų nukleazes (ZFN). Kitaip nei restrikcijos endonukleazės, kurios kerpa DNR tik specifinėse atpažinimo vietose, programuojamos nukleazės leidžia reikšmingai padidinti kirpimo vietų įvairovę bei palikti 1-5 nt lipnius galus, kuriuos gali sudaryti bet kurie iš A, T, C, G nukleotidų.

Naudojant CRISPR-Cas9, Cas12 ar Cas13 sistemas, vedančiosios (angl. *guiding*) RNR (gRNR) yra naudojamos tam, kad nukleazės tiksliai atpažintų ir kirptų pasirinktas DNR ar RNR sritis. Pavyzdžiui, Cas9 paprastai DNR grandinę kerpa simetriškai, palikdama bukus galus. Tačiau neseniai atlikti tyrimai parodė, kad tam tikromis sąlygomis Cas9 gali būti suprogramuota taip, kad paliktų 1-bp lipnius galus (JASIN M et al. Under the Influence: Cas9 Ends and DNA Repair Outcomes. The CRISPR Journal. 2018, Vol.1, No.2, pages 132–134).

Tai yra, programuojamos nukleazės leidžia sukurti įvairių tipų galus (tiek lipnius, tiek bukus) priklausomai nuo poreikio. Kaip minėta, Cas9, esant tam tikroms sąlygoms, gali palikti 1-bp lipnius galus, o Cas12a (Cpf1) palieka 4-5 bp lipnius galus. TALEN ir ZFNs taip pat gali būti pritaikyti kurti lipnius arba bukus galus priklausomai nuo jų dizaino. Derinant skirtingus gRNR dizainus arba skirtingas TALEN ir ZFNs baltymines kompozicijas, galima sumažinti kirpimo vietos sekos specifiškumą, leidžiant nukleazei veikti plačiau ir kirpti mažiau specifinėse sekose.

Tai suteikia galimybę dirbti su platesniu kirpimo vietų diapazonu ir sukurti mažiau specifinius DNR galus, tinkamus sekoskaitos bibliotekoms. Be to, tai leistų taikyti išradimo būdą viso genomo, transkriptomo, egzomo ir panašioms sekoskaitos bibliotekoms paruošti tais atvejais, kai siekiama kuo labiau atsitiktinio kirpimo vietų pasiskirstymo.

Minėtos programuojamos nukleazės ne tik palengvina DNR paruošimą sekoskaitai, išvengiant fosforilavimo ir adenilavimo stadijų, bet taip pat gali būti derinamos su adapterių ligavimu tos pačios reakcijos metu. Tai leidžia sumažinti proceso sudėtingumą ir padidinti bibliotekų paruošimo efektyvumą. Šis būdas neapsiriboja vien minėtomis nukleazėmis ir gali būti taikomas naudojant kitus fermentus, atliekančius panašias funkcijas. Kai kuriais atvejais, naudojant sekoskaitos adapterius su 2-bp ilgio išsikišimais ir DNR kerpančius fermentus tokius kaip Cas12a, kurie palieka ilgesnius nei 1-bp ar 2-bp lipnius galus, reikėtų papildomai panaudoti DNR polimerazę, pavyzdžiui, Taq, ligavimo mišinyje, siekiant užtikrinti efektyvią ligavimo reakciją.

Toliau pateikiami išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai, kurie iliustruoja siūlomą išradimą. Pateikti pavyzdžiai detalizuoja konkrečias metodikas, bet neapriboja išradimo apimties.

#### **Pavyzdžiai 1-5:** Išradimo protokolo įgyvendinimas su skirtingomis restriktazėmis

Šių pavyzdžių tikslas - eksperimentiškai įvertinti RE pagrįsto išradimo protokolo pritaikymą DNR fragmentų paruošimui, vertinant ligavimo efektyvumą su reikalingais adapteriais paeiliui einančių reakcijų metu.

Medžiagos ir metodai:

##### 1-5.1 DNR paruošimas ir amplifikacija

Buvo naudojama 120 nt ilgio seka be atpažinimo sričių kiekvienai iš naudotų RE. Naudotos RE ir jų atpažinimo sritys pateikiamos 1 lentelėje. Unikalioms restrikcijoms endonukleazių atpažinimo sritys buvo pridedamos PGR metu, naudojant pradmenis su RAS jų 5' galuose, kur po RE atpažinimo ir kirpimo visa 3' išsikišusi sritis būtų sudaryta tik iš adeninų (pvz., - AA; -AAA; -AAAA). Naudota seka ir pradmenys pateikiami 2 lentelėje.

PGR reakcijos tūris buvo 25 µl, kurį sudarė 12.5 µl KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems), 0.75 µl (10 µM) tiesioginio ir atvirkštinio pradmens, 1 µl (1 ng/µl) DNR sekos ir H<sub>2</sub>O. Reakciją sudarė pradinė denatūracija (95 °C, 3 min) ir 18 sekančių ciklų, kurių kiekvienas buvo sudarytas iš denatūracijos (98 °C, 20 s), pradmenų hibridizacijos (68 °C, 10 s) bei grandinės ilgėjimo (72 °C, 10 s). Galutinis grandinės ilgėjimas vykdytas 72 °C 10 min.

1 lentelė. Pavyzdžiuose naudotos restrikcijos endonukleazės ir jų atpažįstamos DNR sekos

Pavyzdžio Nr / RE	Gamintojas, katalogo numeris	Atpažinimo sritis
1 / FastDigest MnlI	Thermo Fisher Scientific, FD1074	CCTCNNNNNNNN^ GGAGNNNNNN^N
2 / FastDigest BseGI	Thermo Fisher Scientific, FD1264	GGATGNN^ CCTAC^NN
3 / FastDigest AasI	Thermo Fisher Scientific, FD1724	GACNNNN^NNGTC CTGNN^NNNNCAG
4 / FastDigest Adel	Thermo Fisher Scientific, FD1234	CACNNN^GTG GTG^NNNCAC
5 / FastDigest BstXI	Thermo Fisher Scientific, FD1024	CCANNNN^NTGG GGTN^NNNNNACC

2 lentelė. 1-5 pavyzdžiuose naudotos sekos

120 nt fragmentas	<b>Seka (5' -&gt; 3')</b> TGCATCATCTCTACACATAGCTGCGAGTACGCATCTACAGATCTCGTGT GTATGACAGATCGACGATGATGCGAGATCACGCGTACAGCATCATGACT GCGTGTATCGTCGTAGCGAGTC		SEQ ID Nr. 1
Pavyzdžio Nr. / RE	Pradmuo (F-tiesioginis; R-atvirkštinis)	Seka (5' -> 3')	
1 / MnlI	MnlI_A_F MnlI_A_R	TCACCTCGATTGATTGCATCATCTCTACACATAGC TCACCTCAGTGTCTGACTCGCTACGACGATAC	SEQ ID Nr. 2 SEQ ID Nr. 3
2/ BseGI	BseGI_AA_F BseGI_AA_R	TCAGGATGTTTGCATCATCTCTACACATAGC TCAGGATGTTGACTCGCTACGACGATAC	SEQ ID Nr. 4 SEQ ID Nr. 5
3 / AasI	AasI_AA_F AasI_AA_R	TCAGACAGTTATGTCTGCATCATCTCTACACATAGC TACGACAGTTATGTCTGACTCGCTACGACGATAC	SEQ ID Nr. 6 SEQ ID Nr. 7
4 / Adel	Adel_AAA_F Adel_AAA_R	TCACACTTTGTGTGCATCATCTCTACACATAGC TACCACTTTGTGGACTCGCTACGACGATAC	SEQ ID Nr. 8 SEQ ID Nr. 9
5 / BstXI	BstXI_AAAA_F BstXI_AAAA_R	TCACCAGTTTTATGGTGCATCATCTCTACACATAGC CATCCAGTTTTATGGGACTCGCTACGACGATAC	SEQ ID Nr. 10 SEQ ID Nr. 11

### 1-5.2 Restrikcija

Restrikcijos reakcijos mišinio bendras tūris buvo 30 µl. Mišiniui paruošti buvo naudojama: 150 ng amplifikuoto ir išvalyto PGR produkto, 2 µl FD reakcijos buferio (Thermo Fisher Scientific), 1 µl restrikcijos fermento (Thermo Fisher Scientific) ir H<sub>2</sub>O. Reakcijos mišinys buvo inkubuotas 37 °C temperatūroje 5 minutes, po to fermento aktyvumas buvo inaktyvuotas inkubuojant dar 5 minutes 65–80 °C temperatūroje, priklausomai nuo naudoto fermento.

### 1-5.3 Adapterių konstravimas

Kaip ONT adapterių analogas buvo naudojamas 2 komplementarių oligonukleotidų dupleksas, kurių nukleotidų seka tiksliai atitinka ONT adapterių seką. Naudoti oligonukleotidai buvo: 5'-

CTGTA<sup>CTTCGTT</sup>CAGTTACGTATTGCT-3' (viršutinė grandinė su 3'-T išsikišimu, SEQ ID Nr.12) ir 5'AGCAATACGTA<sup>ACTGAACGAAGTACAG</sup>-3'

(apatinė grandinė, SEQ ID Nr.13). 100 µM kiekvienos sekos buvo sumaišoma su 1 µl T4 ligazės buferio (Thermo Fisher Scientific) ir 7 µl H<sub>2</sub>O. Dupleksų susidarymui, mišinys denatūruotas 95°C 5min, o vėliau laipsniškai vėsintas 5°C/1min iki kol temperatūra pasiekė 25 °C.

#### 1-5.4 Ligavimo reakcija ir elektroforezė

Ligavimui 30 ng produkto po restrikcijos buvo sumaišoma su 25 µl reakcijos buferio (NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer, NEB), paruoštais adapterių dupleksais (išlaikant 1:7 produkto: adapterių santykį), 10 µl T4 ligazės (Quick T4 DNA Ligase, NEB) ir H<sub>2</sub>O. Bendras reakcijos tūris – 100 µl. Reakcija inkubuota kambario temperatūroje 20 min. Praėjus inkubacijos laikui reakcija išvalyta naudojant SPRI paramagnetines daleles, išlaikant 1:1-1,8 DNR ir dalelių santykį bei izopropanolį (Thermo Fisher Scientific). Gautų produktų koncentracija matuota, naudojant Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Rezultatų vizualizavimui naudota kapiliarinės elektroforezės sistema (Agilent D1000 ScreenTape System). Ligavimo efektyvumas kiekvienos restriktažės atveju buvo įvertintas procentais, remiantis fragmentų koncentracijų santykiu iš Agilent pateikiamų kapiliarinės elektroforezės duomenų: fragmento su vienu adapteriu iš bet kurio galo ir fragmento be adapterių, kuris atitiko ryškiausią juostelę ties ~100-120 bazių poromis (bp) (3 pav.).

Rezultatai:

Gauti rezultatai leido palyginti skirtingų RE pritaikomumą ir parodė, jog ligavimas su adapteriais buvo sėkminga atvejais, kai po specifinės RE poveikio buvo paliekamas 1–3 adeninų 3' išsikišimas, o tuo atveju, kai išsikišimas buvo sudarytas iš 4 adeninų (-A) - ligavimas su adapterinėmis sekomis nepavyko (3 pav. A1). Šulinėliai B1 - F1 atitinka adapterines sekas bei fragmentus, gautus atlikus DNR galų paruošimą ligavimui, naudojant MnlI, AasI, Adel, BstXI ir BseGI restrikcijos endonukleazes, atitinkamai. Kaip ir tikėtasi, adapterinių sekų atveju nustatytas ~25 bp dydžio signalas, o po ligavimo naudojant skirtingas RE - skirtingo ilgio fragmentai. Trumpiausi (~100 bp) signalai atitinka seką be adapterių, o ilgesni fragmentai (~130 ir 160 bp) seką su adapteriu viename ar abiejuose sekos galuose. Be to, nustatyta, jog ligacijos efektyvumas varijavo priklausomai nuo naudotos RE. Ligavimo efektyvumo duomenys priklausomai nuo naudotos RE iliustruojamas 3 lentelėje. Rezultatai parodė, kad didžiausias ligavimo efektyvumas buvo nustatytas MnlI atveju, kur santykis tarp nepriliguoto fragmento ir fragmento su vienu adapteriu iš bet kurio galo siekė ~62 %. Tuo tarpu mažiausias efektyvumas nustatytas BseGI atveju, kur šis santykis sudarė ~20 %. Taigi, eksperimentiškai parodyta, kad RE gali būti naudojamos kaip tinkama alternatyva DNR galų paruošimui.

3 lentelė. Ligavimo efektyvumas skirtingų RE atveju

Pavyzdžio Nr / Restriktažė	3' Išsikišimas	Elektroforezės takelis	Ryškiausia linija (pmol/l)	Blankesnė linija (pmol/l)	Efektyvumas (%)
1 / MnlI	A	B1	9520.0	5660.0	59.45
3 / AasI	AA	C1	10600.0	4980.0	46.98
4 / Adel	AAA	D1	7130.0	3760.0	52.73
5 / BstXI	AAAA	E1	15100.0	NA	NA
2 / BseGI	AA	F1	20000.0	3870.0	19.35

Eksperimentai parodė, kad RE gali pakeisti standartiškai naudojamus fermentus ar jų mišinius DNR galų paruošimui. Be to, ligavimas įmanomas ir tais atvejais, kai DNR fragmentas turi 1- 3 nt išsikišimus 3' gale, o adapteris tik vieną 3'-T išsikišimą.

**Pavyzdys 6 (lyginamasis):** Išradimo būdo protokolo ir standartinio DNR fragmentų paruošimo protokolo palyginimas

Šio pavyzdžio tikslas - eksperimentinis RE pagrįsto išradimo būdo pritaikymas DNR fragmentų paruošimui ir jo palyginimas su standartiniu protokolu. Siekiant įvertinti išradimo praktinį pritaikomumą DNR bibliotekos ruošimui naudota BseGI restrikcijos endonukleazė, pasižymėjusi mažiausiu iš testuotų restiktazių ligavimo efektyvumu, o DNR paruošimas ir ligavimas atlikti vienos reakcijos metu.

Medžiagos ir metodai:

#### 1.1 DNR amplifikacija.

DNR fragmentų mišinį sudarė 110000 unikalių DNR sekų, kurių kiekviena turėjo bendras tiesioginio ir atvirkštinio pradmens kibimo sritis. Pirmiausia, DNR fragmentai buvo padauginti, naudojant PGR, su sekai specifiniais pradmenimis (standartinio protokolo atveju) ir pradmenimis, papildomai turinčiais BseGI RE atpažinimo sritis 5' galuose (išradimo protokolo atveju) (žr. 4 lentelę). PGR reakcijos tūris buvo 25 µl, kurį sudarė 12.5 µl KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems), po 0.75 µl (10 µM) tiesioginio ir atvirkštinio pradmens, 1 µl (1 ng/µl) DNR fragmentų mišinio ir H<sub>2</sub>O. Reakciją sudarė pradinė denatūracija (95°C, 3 min) ir 20 sekančių ciklų, kurių kiekvienas buvo sudarytas iš denatūracijos (98 °C, 20 s), pradmenų hibridizacijos (72 °C, 10 s) bei grandinės ilgėjimo (72 °C, 10 s). Galutinis grandinės ilgėjimas vykdytas 72 °C 10 min.

4 lentelė. 6 pavyzdyje naudotos pradmenų sekos

Protokolas	Pradmuo	Seka	
Standartinis	Tiesioginis	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	SEQ ID Nr. 14
Standartinis	Atvirkštinis	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	SEQ ID Nr. 15
Siūlomas	Tiesioginis	TCAGGATGTTTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAG	SEQ ID Nr.16
Siūlomas	Atvirkštinis	TCAGGATGTTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTAT AAGAGACAG	SEQ ID Nr.17

#### 1.1. DNR fragmentų paruošimas naudojant išradimo protokolą

Naudojant RE pagrįstą išradimo protokolą, DNR fragmentų fosforilimas, adenilimas ir ligavimas su adapteriais buvo atlikti vienos reakcijos metu. Reakcijos tūris 30 µl, sudarytas iš 250 fmol PGR mišinio, 5 µl sekoskaitos adapterių (ONT), 2 µl FD buferio, 2 µl ATP (10 mM), 1 µl BseGI RE ir 5 µl T4 DNR ligazės. Reakciją sudarė 6 pasikartojantys ciklai: 37°C 5 min ir 21°C 5 min. Po reakcijos atliktas valymas, naudojant magnetines daleles, išlaikant 1:1,8 DNR:dalelių santykį.

#### 1.2. DNR fragmentų paruošimas naudojant standartinį protokolą

Standartinio protokolo atveju biblioteka buvo ruošiama naudojant NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing rinkinį (New England Biolabs) ir T4 DNR ligazę (NEBNext® Quick Ligation Module).

Reakcijos tūris buvo 60 µl, sudarytas iš 50 µl PGR mišinio (250 fmol DNR fragmentų, atskiestų Milli-Q vandeniui), 7 µl End-prep buferio ir 3 µl End-prep fermentų mišinio. Mėginiai buvo inkubuoti 20°C 5 min ir 65°C 5 min. Po inkubacijos atliktas valymas, naudojant SPRI daleles (AMPure XP Beads, Beckman Coulter), išlaikant 1:1 DNR: dalelių santykį. Po valymo atliktas 10 min ligavimas su sekoskaitos adapteriais pagal gamintojo rekomendacijas. Po inkubacijos atliktas dar vienas valymas, naudojant SPRI daleles, išlaikant 1:1,8 DNR: dalelių santykį.

### 1.3. Sekoskaita

Sekoskaitai buvo naudota ~40 fmol paruoštų DNR fragmentų, ir ji buvo vykdyta 24 h, naudojant PromethION (R10.4.1) celes (ONT) bei P2 solo (ONT) sekvenatorių.

Rezultatai:

4 pav. iliustruoja išradime siūlomo būdo, lyginant su standartiniu protokolu, akivaizdų pranašumą sugeneruotų sekų aspektu. Grafike (A) vaizduojamas sugeneruotų aukštos kokybės sekų kiekio priklausomybės nuo laiko palyginimas. Grafike (B) pateiktas sugeneruotų sekų kokybės pasiskirstymo palyginimas.

5 lentelėje pateiktas bendrųjų charakteristikų palyginimas tarp DNR fragmentų, paruoštų naudojant išradimo RE pagrįstą būdą ir standartinį protokolą, apimantis eksperimento laiką, nuskaitytų sekų skaičių, aukštos kokybės sekų ( $Q \geq 9$ ) ir žemos kokybės sekų ( $Q < 9$ ) kiekį, nenustatytos kokybės sekas, sekų sutapimo su referentinėmis sekų procentą, ir klaidų dažnį.

5 lentelė. Bendrųjų sekoskaitos metrikų palyginimas, kai bibliotekos paruošimui buvo naudota BseGI restrikcijos endonukleazė

DNR paruošimo būdas	Siūlomas	Standartinis
<b>Eksperimento laikas (min)</b>	1459	1452
<b>Nuskaitytos sekos</b>	60433323	31424840
<b>Aukštos kokybės sekos (<math>Q \geq 9</math>)</b>	43464189	25526346
<b>Žemos kokybės sekos (<math>Q &lt; 9</math>)</b>	16979860	5915454
<b>Nenustatytos kokybės sekos</b>	34	25
<b>Sekos, sutapusios su referentinėmis sekomis</b>	42638369	25347661
<b>Sekos, sutapusios su referentinėmis sekomis (%)</b>	98.1	99.3
<b>Klaidų dažnis (%)</b>	2.54	2.05

Rezultatai leido palyginti siūlomo sprendimo efektyvumą ir parodė, kad išradimo RE pagrįstas protokolai leido nuskaityti ~192% daugiau sekų per tą patį laiko tarpą, lyginant su standartiniu būdu (žr. 5 lentelę). Be to, siūlomo išradimo atveju ~72% visų sugeneruotų sekų buvo aukštos kokybės ( $Q \geq 9$ ), o klaidų dažnis išliko panašus kaip ir standartinio protokolo atveju (2,54% lyginant su 2,05%). Taigi, eksperimentiškai parodyta, kad siūlomo išradimo būdu paruoštų DNR fragmentų sekoskaitos efektyvumas yra didesnis, lyginant su standartiniu protokolu, išlaikant panašią kokybę.

Rezultatai akivaizdžiai įrodo išradimo būdo pranašumus, ypač jo lankstumą ir gebėjimą sėkmingai veikti net esant įvairioms galinėms DNR struktūroms, tuo užtikrinant didesnį nuskaitytų sekų kiekį ir patikimumą. Taigi, šis būdas suteikia reikšmingą techninį pranašumą prieš kitus DNR paruošimo būdus.

**Pavyzdys 7.** Bioinformatinė analizė, įrodanti DNR fragmentų su 3'-AA išsikišimu ir adapterių su vieno nukleotido -T ligavimo efektyvumą

Šio pavyzdžio tikslas – įvertinti DNR fragmentų, turinčių 3'-AA išsikišimą, ligavimo efektyvumą su adapteriais, turinčiais vieno nukleotido -T išsikišimą. Bioinformacinės analizės metu buvo tiriamas ligavimo efektyvumas ir sekos vientisumas, naudojant dalį sekoskaitos duomenų, gautų pavyzdyje 6.

Medžiagos ir metodai:

#### 7.1. DNR bibliotekos paruošimas

DNR bibliotekos buvo paruoštos naudojant BseGI restrikcijos fermentą, kuris palieka dviejų nukleotidų 3'-AA išsikišimą DNR fragmentų galuose. Paruošta biblioteka buvo sekvenuojama naudojant ONT PromethION platformą, kaip aprašyta pavyzdyje 6.

#### 7.2. Analizė

Bazių nustatymui sekos buvo išanalizuotos naudojant „Dorado v0.7.0“ programinę įrangą su modeliu dna\_r10.4.1\_e8.2\_400bps\_sup@v5.0.0. Sekos buvo filtruotos pagal kokybės kriterijų, atrenkant tik tas, kurių vidutinė kokybės balo reikšmė buvo  $\geq 9$ . Siekiant išsaugoti ligavimo vietas, sekų galai nebuvo karpomi. Filtruoti fastq failai buvo konvertuoti į fasta formatą naudojant „SeqKit v2.8.1“. Šis žingsnis buvo reikalingas tolimesnei sekų analizei ir lyginimui. Naudojant „BLAST+ v2.15.0“, sekos buvo lyginamos su adapterių ir pradmenų sekomis iš pasirinktinių duomenų bazių, siekiant nustatyti jų pozicijas skaitymuose. Taip pat buvo specialiai sukurtas „Julia v1.10.5“ programa-skriptas, kuris atliko šiuos veiksmus:

identifikavo skaitymus su AA išsikišimu, prijungtu prie T-adapterio;

apskaičiavo skaitymų dalį, kuriose ligazė sėkmingai suligavo DNR galus nepaisant vieno nukleotido tarpo tarp adapterio ir pradmens sekos.

#### 7.3. Rezultatai:

5 pav. pavaizduotas sekų išsidėstymas adapterio ir DNR jungties vietoje prieš ligavimo procesą. Kairėje pusėje pateiktos trumpos sekos vaizduoja adapterio galinę sritį su vieno timino išsikišimu. Paryškintas šriftas žymi pradmens sritį DNR bibliotekos gale po RE veikimo ir susidariusį išsikišimą. „XXXX“ žymi tolesnę DNR bibliotekos fragmento seką. A ir B dalyse atitinkamai pavaizduota situacija ties skirtingais pradmenimis, naudotais amplifikacijos procese. Tai, kas gaunama po ligavimo, remiantis sekoskaitos duomenimis, parodyta 6 pav.

6 pav. atvaizduoja sekų konfiguraciją ir ligavimo efektyvumo vertinimą adapterio ir sekvenuojamos DNR jungties vietoje. Diagramos iliustruoja galutinius sekų konstruktus po ligavimo. Didžiosiomis raidėmis pažymėti simboliai atspindi adapterio seką (kairėje) arba pradmens srities seką (dešinėje), o mažosiomis paryškinto šrifto raidėmis pažymėtas fragmentas nurodo naujai suformuotą jungtį tarp adapterio ir DNR po ligavimo. A ir B dalyse pavaizduotas skirtingų sekos konstrukto pasiskirstymas po ligavimo, naudojant skirtingus pradmenis (SEQ ID Nr. 16 ir SEQ ID Nr. 17, 4 lentelė), atspindintis galutinių sekų variantų pasiskirstymą ir ligavimo proceso efektyvumą kiekvienai konfiguracijai.

SEQ ID Nr. 18–22, pavaizduoti 6 pav. A dalyje, iliustruoja jungtis, susidariusias dalyvaujant tiesioginio pradmens sričiai (SEQ ID Nr. 16, 4 lentelė). DNR fragmento galo sekos 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGXXX-3' 3'-AAAGCAGCCGTCGCAGTCTACACATATTCTCTGTCXXX-5' (SEQ ID Nr. 23 ir SEQ ID Nr. 24), susidariusios veikiant restriktaze šią sritį, pavaizduotos 5 pav. A dalyje.

SEQ ID Nr. 25–29, parodyti 6 pav. B dalyje, vaizduoja jungtis, susidariusias dalyvaujant atvirkštinio pradmens sričiai (SEQ ID Nr. 17, 4 lentelė). DNR fragmento galo sekos 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGXXXX-3'/ 3'-AACAGAGCACCCGAGCCTCTACACATATTCTCTGTCXXXX-5', susidariusios veikiant restriktaze šią sritį, pavaizduotos 5 pav. B dalyje ir atitinka SEQ ID Nr. 30–31. Sekos, pavaizduotos 6 pav., pateiktos 6 lentelėje.

6 Lentelė. Dažniausiai sekoskaitos duomenyse randamos jungtys po ligavimo ir jų dažnis (dalis) naudojant siūlomas būdą, atliktą, naudojant restriktazę BseGI

Ligavimo sritis	Dalis	Pradmuo	SEQ ID Nr.
ATTGcttCGTCG	0.67	tiesioginis	SEQ ID Nr.18
ATTGctttCGTCG	0.25	tiesioginis	SEQ ID Nr.19
ATTGcttttCGTCG	0.03	tiesioginis	SEQ ID Nr.20
ATTGctCGTCG	0.01	tiesioginis	SEQ ID Nr.21
ATTGctgtttCGTCG	0.01	tiesioginis	SEQ ID Nr.22
ATTGctGTCTC	0.91	atvirkštinis	SEQ ID Nr.25
ATTGcttGTCTC	0.07	atvirkštinis	SEQ ID Nr.26
ATTGctgGTCTC	0.01	atvirkštinis	SEQ ID Nr.27
ATTGctgctgctcaGTCTC	0.00	atvirkštinis	SEQ ID Nr.28
ATTGctgtttGTCTC	0.00	atvirkštinis	SEQ ID Nr.29

6 pav. kiekvieno stulpelio aukštis nurodo santykinę sėkmingai liguotų konstruktyų frakciją. Pradmens varianto A (pradmens 3' galo seka: AAA) atveju, po restriktazės poveikio susidaro dviejų nukleotidų AA išsikišimas (5 pav. A). Teorinis tarpas tarp adapterio ir pradmens sekos yra „tt“. Tai patvirtinta duomenyse 67 % atvejų, parodant, kad ligazė sėkmingai suligavo DNR galus nepaisydama vieno nukleotido tarpo (6 pav. A).

Pradmens varianto B (pradmens 3' galo seka: CAA) atveju, po restriktazės poveikio taip pat susidaro dviejų nukleotidų AA išsikišimas (5 pav. B). Šiuo atveju teorinis tarpas tarp adapterio ir pradmens sekos yra „t“. Duomenyse tai patvirtinta 91 % atvejų, dar kartą parodant, kad T4 DNR ligazė efektyviai liguoja DNR fragmentus net esant tarpui (6 pav. B).

Analizė parodė, kad DNR fragmentų su 3'-AA išsikišimu ligavimas prie adapterių su vieno nukleotido T išsikišimu yra labai efektyvus. Rezultatai patvirtina, kad ligazė gali patikimai sujungti DNR galus net esant

tarpu, taip užtikrinant šio metodo pritaikomumą įvairiems DNR bibliotekų paruošimo atvejams, išlaikant aukštą sekos kokybę ir vientisumą.

Apibendrinant, išradimo rezultatai parodė, kad siūlomas metodas, naudojant restriktazes iš grupės, kuri apima MnlI, MboII, Eam1105I, Taal, Eco57I, BseMI, AasI, Van91I, BglI, Cail, BseGI, BseLI, Adel, HpyF10VI, Mph1103I ir BstXI, efektyviai vykdo adapterių ir DNR fragmentų ligavimą. Net jei naudojama mažiausio efektyvumo restriktazė (BseGI), rezultatai patvirtino, kad išradimo metodas užtikrina sėkmingą adapterių prijungimą.

Pastebėta, kad ligavimas buvo sėkmingas net tuomet, kai vieno DNR fragmento 3'-galas turėjo vieno nukleotido išsikišimą, o kito – dviejų ar trijų nukleotidų išsikišimus (pvz., 3'- AA). Tai prieštarauja įprastinei prielaidai, kad nesuderinami galai negali efektyviai susijungti veikiant T4 ligazei, ir įrodo metodo lankstumą bei platų pritaikomumą bibliotekų paruošimui. Šį netikėtą rezultatą patvirtina ir ankstesni tyrimai, kurie parodė, kad T4 ligazė gali liguoti fragmentus su vieno nukleotido tarpu, nors manoma, kad toks ligavimas yra mažiau efektyvus, nei naudojant pilnai suderinamus substratus (GOFFIN C et al. Nicks 3' or 5' to AP sites or to mispaired bases, and one-nucleotide gaps can be sealed by T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Research*. 1987, Vol.15, No.21, pages 8755–8771).

Išvados:

1. Siūlomas RE pagrįstas būdas leidžia efektyviai liguoti DNR fragmentus net esant nepilnai suderinamiems galams, praplečiant metodo taikymo ribas.
2. Nustatyta, kad T4 ligazė geba veiksmingai sujungti fragmentus, esant mažesniai nei trijų nukleotidų tarpui tarp 3' ir 5' DNR fragmentų galų
3. Šis metodas parodo didesnę lankstumą nei tradiciniai požiūriai ir suteikia naujų galimybių DNR bibliotekų kūrimui.

Šie rezultatai rodo naują požiūrį į DNR fragmentų ligavimą, atveriant naujas perspektyvas molekulinės biologijos srityje.

Bendra išvada dėl siūlomo būdo privalumų:

Siūlomas DNR bibliotekos paruošimo būdas gali užtikrinti, pavyzdžiui, didesnę sekoskaitos efektyvumą, išlaikant panašią nuskaitytų sekų kokybę. Naudojant šį būdą, galima 1,9 karto padidinti nuskaitytų sekų kiekį per tą patį laiko tarpą, nepadidinant klaidų dažnio, lyginant su tradiciniais DNR paruošimo būdais.

Naudojant siūlomą būdą, efektyvų DNR bibliotekų paruošimą galima užtikrinti ir naudojant ne visiškai suderinamus sekas ir adapterius. T4 ligazė gali inicijuoti ligavimo reakciją su 1-3 nukleotidų tarpu, žymiai praplečiant siūlomo būdo taikymo ribas.

Programuojamos nukleazės, tokios kaip Cas9, Cas12, Cas13, TALEN ir ZFNs, leidžia žymiai padidinti DNR ir RNR kirpimo vietų įvairovę, todėl jos gali būti veiksmingai naudojamos kaip restriktazių analogai DNR fragmentų paruošimui.

### **Pramoninis pritaikomumas**

Šiuo metu viena plačiausių taikymo sričių yra aukštos kokybės DNR sekoskaitos rezultatų gavimas, leidžiantis padidinti nuskaitytų sekų kiekį ir jų kokybę, taip užtikrinant gautų rezultatų patikimumą. Tačiau šios srities specialistams aišku, kad išradimo siūlomas būdas turi platų pritaikomumą įvairiems tikslams, neapsiribojant DNR sekoskaita. Siūlomas techninis sprendimas gali būti naudingas įvairiuose genetiniuose tyrimuose, kur reikia tiksliai ir efektyviai paruošti DNR fragmentus.

Tai apima:

- Genomikos tyrimus, kur didelis sekų kiekis ir aukšta kokybė yra svarbūs, siekiant gauti tikslius geno analizės rezultatus.
- Medicinos diagnostiką, kur greiti ir tikslūs DNR sekoskaitos rezultatai gali padėti nustatyti genetinius sutrikimus ar ligas.
- Biotechnologijos pramonę, kur efektyvus DNR fragmentų paruošimas gali pagerinti genetinės inžinerijos ir klonavimo procesų našumą.
- DNR imobilizavimą ant paviršių, kur suteiktą galimybę paruošti DNR fragmentus taip, kad jie būtų efektyviai ir stabiliai imobilizuojami ant paviršių, kuriant tikslius biologinius sensorius ar tiriant specifines molekulių sąveikas.
- Struktūrinius DNR tyrimus, kur reikia paruošti tiksliai apibrėžtus DNR fragmentus, siekiant suprasti jų sąveikas su baltymais ar kitomis biomolekulėmis.
- CRISPR pagrįstas technologijas, kur būtina tiksliai paruošti DNR fragmentus geno redagavimui ir vektorių kūrimui.
- Duomenų saugojimą naudojant DNR, kur reikia didelio patikimumo, stabilumo ir tikslumo, norint efektyviai saugoti ir atkurti duomenis, koduojamus DNR molekulėse.

## IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. DNR bibliotekos paruošimo būdas, apimantis:

- DNR fragmentų galų paruošimą, siekiant gauti turintį bent vieno nukleotido ilgio išsikišimą 3' gale ir laisvą fosfato grupę 5' gale, ir
- DNR fragmentų ligavimą su adapteriais, pasižyminčiais vieną nukleotidą turinčiu išsikišimu adapterinės sekos 3' gale, kur adapterinės sekos išsikišimo nukleotidas yra komplementarus bent vienam DNR fragmento išsikišimo nukleotidui, ir
- nebūtinai vykdo DNR fragmentų padauginimą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, k a d
- DNR fragmentų galų paruošimą arba galų paruošimą kartu su DNR fragmentų ligavimu vykdo veikiant restrikcijos endonukleaze, gebančia po DNR kirpimo palikti bent vieno nukleotido ilgio išsikišimą 3' gale, arba veikiant tokios restrikcijos endonuklezės funkciniu analogu;
- o DNR fragmentų padauginimą vykdo su pradmenimis, apimančiais restrikcijos endonukleazei būdingą restrikcijos atpažinimo sritį.

2. Būdas pagal 1 punktą, kur DNR galų paruošimą vykdo vienu metu su ligavimu, kai minėta restrikcijos endonukleazė yra gebanti palikti 1-3 nukleotidų ilgio išsikišimą paruošto DNR fragmento 3' gale, kur bent vienas nukleotidas yra adeninas, o adapterinės sekos išsikišimo nukleotidas yra timinas.

3. Būdas pagal 2 punktą, kur minėtas paruošto DNR fragmento 1-3 nukleotidų ilgio išsikišimas 3' gale yra 1-3 adeninų išsikišimas.

4. Būdas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, kur minėta restrikcijos endonukleazė yra pasirinkta iš MnlI, MbolI, Eam1105I, Taal, Eco57I, BseMI, AasI, Van91I, BglI, Cail, BseGI, BseLI, Adel, HpyF10VI, Mph1103I arba BstXI.

5. Būdas pagal bet kurį iš 1-4 punktų, kur minėtas adapteris yra sekoskaitos adapteris.

6. Būdas pagal 1 punktą, kur minėtos restrikcijos endonukleazės funkcinis analogas yra pasirinktas iš grupės, kurią sudaro programuojamos nukleazės, tokios kaip Cas9, Cas12, Cas12a (Cpf1), Cas13 ir į transkripcijos faktorius panašios efektorinės nukleazės (TALEN) ir cinko pirštų nukleazės (ZFN).

7. Būdas pagal 6 punktą, kur restrikcijos endonukleazės funkcinis analogas yra gebantis sudaryti DNR fragmentų galus su 1-3 bp išsikišimais 3' gale.

8. Būdas pagal bet kurį iš 1–5 punktų, kur ligavimą vykdo su T4 ligaze be tarpinių etapų, kai DNR fragmentų galų paruošimo ir adapterių ligavimo reakcijos mišinyje yra:

- padaugintų DNR fragmentų su RAS 200-400 fmoI;
- adapterių [5–10 kartų didesnio molinio kiekio nei padaugintų DNR fragmentų su RAS] 1000 – 4000 fmoI;
- 10 kartų koncentruoto greito kirpimo restrikcijos endonukleazių buferio 2 µl;
- ATP (10 mM) 0,3 - 3 µl;

- greito kirpimo restrikcijos endonukleazės, kurios 1 μl per 5 min, esant optimalioms sąlygoms, sukarmo >200 ng DNR 1 μl;
- T4 DNR ligazės (2,000,000 Weiss vienetai/ml) 1,0-5,0 μl;
- sterilaus vandens be nukleazių iki 30 μl reakcijos mišinio tūrio; ir reakcijos sąlygos apima inkubaciją 37–65° C 5 min ir 21–23° C 5 min, o kiekvieną reakciją sudaro 5-8 pasikartojantys ciklai.

9. Ligavimo jungties konstruktas, gaunamas būdu pagal bet kurį vieną iš 1-5 ir 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, kad jis yra sukonstruotas sėkmingam ligavimui ir apima DNR fragmentą su 1-3 nukleotidų, pasirinktų iš A, T, C arba G, išsikišimu 3' gale, bei adapterį su tik vieno nukleotido išsikišimu 3' gale, kur adapterinės sekos išsikišimo nukleotidas yra komplementarus bent vienam DNR fragmento išsikišimo nukleotidui; ir kur konstrukto struktūra yra pasirinkta iš:

- 5'-Frag-X-3' / 3'-X-cFrag-5',
- 5'-Frag-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5',
- 5'-Frag-X-3' / 3'-X-X-cFrag-5',
- 5'-Frag-X-X-3' / 3'-X-X-cFrag-5',
- 5'-Frag-X-X-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5' arba
- 5'-Frag-X-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5',

kur:

„Frag“ žymi DNR fragmentų viršutinę grandinę,

„cFrag“ žymi jai komplementarią apatinę grandinę, ir

„X“ žymi vieną DNR nukleotidą, kuris yra viengrandžio išsikišimo dalis, pasirinktą iš A, T, C arba G.

10. Ligavimo jungties konstruktas pagal 9 punktą, sukonstruotas sėkmingam ligavimui per tarpą, kur konstruktas apima DNR fragmentą su dviejų arba trijų nukleotidų, pasirinktų iš A, T, C arba G, išsikišimu 3' gale, bei adapterį su tik vieno nukleotido išsikišimu 3' gale, kur adapterinės sekos išsikišimo nukleotidas yra komplementarus bent vienam DNR fragmento išsikišimo nukleotidui; ir kur konstrukto struktūra yra pasirinkta iš:

- 5'-Frag-X-X-3' / 3'-X-X-cFrag-5',
- 5'-Frag-X-X-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5' arba
- 5'-Frag-X-X-3' / 3'-X-X-X-cFrag-5'.

11. Ligavimo jungties konstruktas pagal 10 punktą, kur dviejų arba trijų nukleotidų išsikišimas DNR fragmento 3' gale yra 2-3 adeninai, o adapteris apima tik vieno timino išsikišimą 3' gale; kur konstrukto struktūra yra pasirinkta iš:

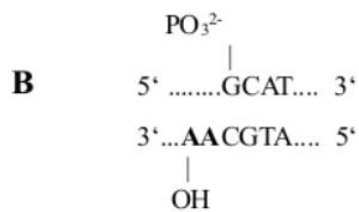
- 5'-Frag-A-A-3' / 3'-A-A-cFrag-5',
- 5'-Frag-A-A-A-3' / 3'-A-A-A-cFrag-5', arba
- 5'-Frag-A-A-3' / 3'-A-A-A-cFrag-5'.

12. Būdo pagal bet kurį iš 1-5 punktų panaudojimas kai DNR fragmentai yra gauti de novo DNR sinteze.

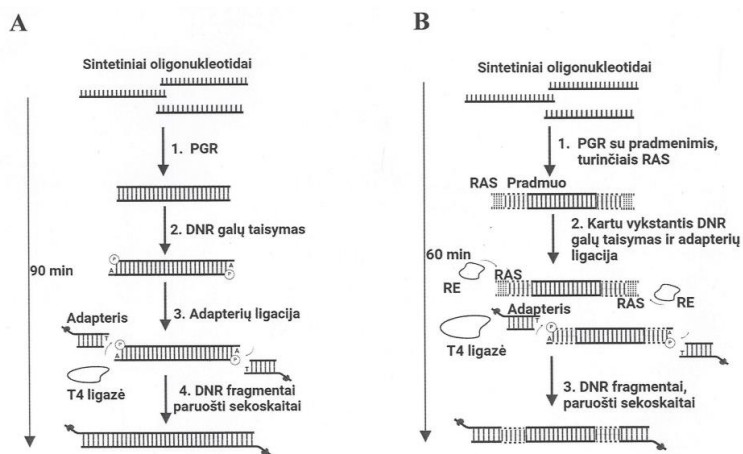
13. Būdo pagal 12 punktą panaudojimas duomenų saugojimo DNR taikymuose.

14. Būdo pagal bet kurį iš 1 arba 6-7 punktų panaudojimas, kai DNR fragmentai yra gauti de novo DNR sinteze.

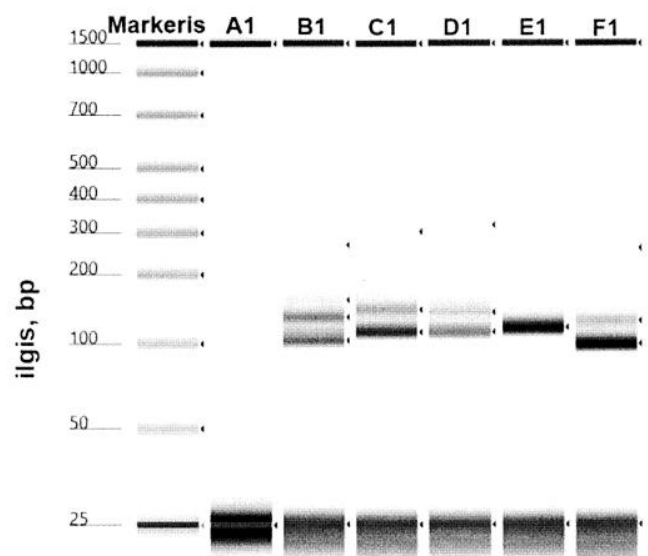
15. Būdo pagal 14 punktą panaudojimas duomenų saugojimo DNR taikymuose.



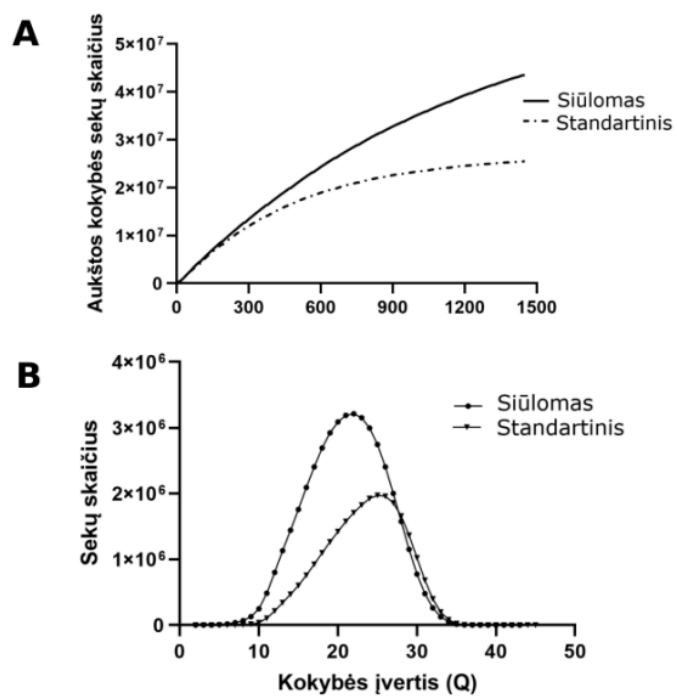
1 pav.



2 pav.



3 pav.

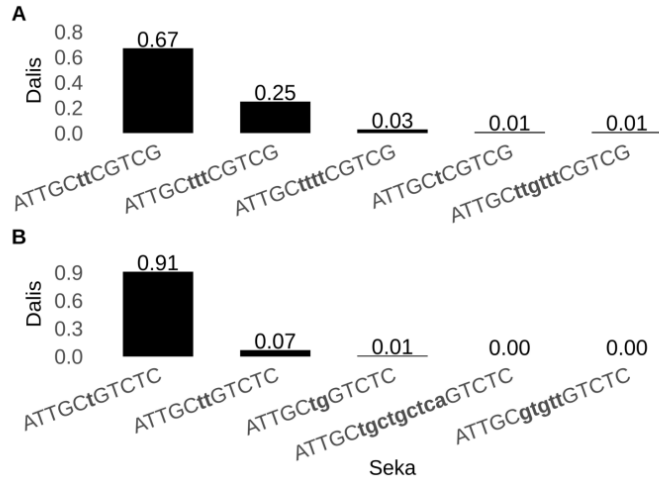


4 pav.

**A** 5' ...TATTGCT TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGXXXX  
 3' ...ATAACG AAAGCAGCCGTCGCAAGTCTACACATATTCTCTGTCXXXX

**B** 5' ...TATTGCT GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGXXXX  
 3' ...ATAACG AACAGAGCACCCGAGCCTCTACACATATTCTCTGTCXXXX

5 pav.



6 pav.